

REC'D 03 SEP 1999
WIPO PCT

PCT/JP99/03837
16.07.99

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

EJ KU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 8月21日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第236148号

出 願 人
Applicant(s):

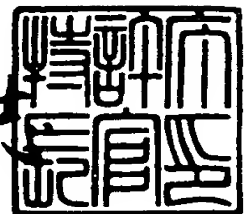
東 市郎
林 昭
住友製薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月 5日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

伴 佐 山 建 志



出証番号 出証特平11-3055060

【書類名】 特許願

【整理番号】 132523

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/15
A61K 35/74

【発明の名称】 製剤分析方法

【請求項の数】 10

【発明者】

 【住所又は居所】 札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号

 【氏名】 東 市郎

【発明者】

 【住所又は居所】 茨木市蔵垣内1丁目3番45号 住友製薬株式会社内

 【氏名】 濱松 典郎

【発明者】

 【住所又は居所】 茨木市蔵垣内1丁目3番45号 住友製薬株式会社内

 【氏名】 藤永 稔夫

【特許出願人】

 【識別番号】 592028019

 【氏名又は名称】 東 市郎

【特許出願人】

 【識別番号】 597032387

 【氏名又は名称】 林 昭

【特許出願人】

 【識別番号】 000183370

 【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100107629

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 中村 敏夫

【電話番号】 06-466-5214

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710701

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 製剤分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の工程を含むことを特徴とする、細菌の菌体成分を有効成分とする生物活性製剤の分析方法：

(a) 細菌の菌体成分を含む製剤にレクチン溶液を添加し

(b) レクチンとの凝集反応がないことを指標として細菌の菌体成分が充分被覆されている製剤を選別する。

【請求項 2】

細菌の菌体成分を有効成分とする製剤が、水中油型エマルジョン製剤である請求項 1 記載の分析方法。

【請求項 3】

レクチンがコンカナバリン A である請求項 1 および 2 記載の分析方法。

【請求項 4】

細菌の菌体成分が BCG-CWS あるいはノカルジア・ルプレー CWS である乳化製剤の請求項 1 から 3 に記載記載の分析方法。

【請求項 5】

細菌の菌体成分を有効成分とする製剤において、下記の工程を含むことを特徴とする、菌体成分が油状物質に充分被覆された製剤の分析方法：

(a) 細菌の菌体成分を含む製剤にレクチン溶液を添加し

(b) レクチンとの凝集反応が無いことを指標として細菌の菌体成分が充分被覆されていることを分析する。

【請求項 6】

細菌の菌体成分を有効成分とする製剤が水中油型エマルジョン製剤である請求項 5 記載の分析方法。

【請求項 7】

レクチンがコンカナバリン A である請求項 5 および 6 記載の分析方法。

【請求項 8】

細菌の菌体主成分がBCG-CWSあるいはノカルジア・ルプレーCWSである請求項5から8に記載記載の分析方法。

【請求項9】

請求項1あるいは5記載の分析方法によって選別され得られた、菌体成分が充分油状物質で被覆された生物活性製剤。

【請求項10】

水中油型エマルジョン製剤を使用して得られる請求項9記載の生物活性製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、レクチンが糖類に特異的に反応する性質を用いて、細菌の菌体成分を含有する製剤に関して簡便に生物活性を有する製剤を検定選別する方法または、菌体成分が油状物質で充分被覆されていることを分析する方法に関するものである。さらには、その選別方法を用いて選別された生物活性製剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

微生物死菌、細菌の細胞壁骨格成分 (Cell Wall Skeleton、以下、CWSと略す)、ムラミルジペプチド (MDP)、リポ多糖 (LPS)、マンナン、グルカンおよびこれらの誘導体、植物や真菌の多糖類等の免疫賦活作用を有する細菌の菌体成分 (場合によっては組換えDNA法により産生されるものを含む) および非細菌性物質などの生物活性成分は、免疫刺激作用を有し、例えば実験的腫瘍系およびヒト癌の免疫療法において抗腫瘍活性を示すことが知られている。しかも、生物活性成分が、ホモジナイザー等の分散・乳化機により油状物質中に分散され、さらに、界面活性剤溶液にて乳化されて水中油型エマルジョンに製剤化された場合、免疫賦活作用に伴う抗腫瘍効果や感染防御効果がよく発揮されることが知られている (Cancer Res., 33, 2187-2195 (1973)、J. Nat. Cancer Inst., 48, 831-835 (1972)、J. Bacteriol., 94, 1736-1745 (1967)、Gann, 69, 619-626 (1978)、J. Bacteriol., 92, 869-879 (1966))。

【0003】

しかし、上記療法で使用する製剤は、用時調製で少量調製される水中油型エマルジョンで、使用する油状物質の量が少ないこともあり、公知製造方法（J.Nat. Cancer inst. 18, 831-836 (1972)、J. Bacteriol. 92, 869-879 (1966)、Gann, 69, 619-626 (1978)）では分散工程の機械化とスケールアップが困難であったため、癌免疫療法製剤の有用性が報告されていたにもかかわらず一般化されていなかった。

【0004】

そこで、本発明者らは、上記公知製剤方法の改良で工業的製造法の確立をするべく検討を重ね医薬品としての実用化を目指した。上記にも示したように水中油型エマルジョン製剤では、免疫賦活作用に伴う抗腫瘍効果や感染防御効果がよく発揮されることから、改良製造方法で得られた水中油型エマルジョンの油滴の平均粒子径または粒度分布の状態、濁度の測定等で物理的な分析を行いこれを指標として改良製剤の同等性の分析を行っていた。また、上記改良製剤の生物活性の同等性を分析するため癌細胞を移植したマウスなどの実験的腫瘍系モデルを用いて癌の転移抑制効果を指標として検定選別していた。

しかし、製造工程が異なる製剤品は上記分析方法で得られた油滴の平均粒子径、粒度分布の測定、顕微鏡下での外形観察等の物性は公知乳化製剤とほぼ同一であるにもかかわらず、上記生物活性試験においては、必ずしも活性を有しない製剤品のあることがわかった。このように、細菌の菌体成分を有効成分とする製剤においては、単に乳化製剤として水中油型エマルジョンになっていれば生物活性があるというものでないことが見いだされてきた。

すなわち、細菌の菌体成分を有効成分とする製剤は、その生物活性が製剤内容や製造法に依存して大きく影響を受けることがわかった。このことから製剤品の品質を分析する指標としては、上記物理的分析方法のみでは確実性を欠くことがわかった。また、実験的腫瘍系モデルを用いての癌の転移抑制効果を指標とする生物活性評価はマウスなどの実験動物、特別な実験施設および熟練の技術者を必要とするため、大量のサンプルを短時間で簡便に分析し、適切な製剤品と製造方法を評価選別することが困難であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、従来法では検定選別できない製剤の新たな分析方法を提供することにある。すなわち、本発明は、細菌の菌体成分を有効成分とする製剤の中で、免疫賦活作用を有する生物活性製剤を検定選別する方法を提供するものである。さらに詳しくは、生物活性を示す製剤として細菌の菌体成分が充分油状物質で被覆されていることが必須であり、そのためレクチンによる菌体成分の凝集反応を利用して細菌の菌体成分を有効成分とする製剤の中で充分油状物質で被覆された菌体成分を有する製剤を検定選別する方法を提供するものである。

また、本発明では上記の分析方法で選別し取得される充分油状物質で被覆された生物活性製剤を提供するものである。

【0006】

【発明が解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、上記製剤の同等性および生物活性の有無を予測しうる分析方法を確立し本発明を完成するに至った。すなわち有効な免疫賦活作用を維持させた細菌の菌体成分を有効成分とする製剤は、主成分が油状物質などで充分被覆されていることが必須であることを見いだした。そこで、菌体成分が油状物質で充分被覆されていることを評価検定するための方法を種々検討した結果、糖類に特異的に反応を示すレクチンを用い菌体成分を構成する糖鎖との凝集反応に着目し、この反応を評価検定法として用いることで菌体成分が油状物質で充分被覆されているか否かを評価できることを見いだした。すなわち本発明では、レクチンと菌体成分の糖鎖（アラビノガラクトン）との間に働く相互作用を利用している。菌体成分が充分被覆されていることは、すなわち糖鎖も同じく充分被覆されていることであり、糖鎖が充分被覆されていれば上記の相互作用は生じない。すなわち、凝集反応が陰性を示す場合、主成分は充分被覆されていることになる。また、生物活性成分が油状物質で充分被覆されていることで免疫賦活作用に伴う抗腫瘍効果や感染防御効果が発揮されることから、レクチン凝集反応に陰性を示すことを指標として生物活性の有無が判定できることになる。

【0007】

これらの知見に基づき、本発明の要旨は次のように示される。

(1) 下記の工程を含むことを特徴とする、細菌の菌体成分を有効成分とする生物活性成分を保持した製剤の分析方法：

(a) 細菌の菌体成分を含む製剤にレクチン溶液を添加し

(b) レクチンとの凝集反応がないことを指標として細菌の菌体成分が充分被覆されている製剤を選別する。

(2) 細菌の菌体成分を有効成分とする製剤が、水中油型エマルジョン製剤である上記 1 記載の分析方法。

(3) レクチンがコンカナバリン A である上記 1 および 2 記載の分析方法。

(4) 細菌の菌体成分が BCG-CWS あるいはノカルジア・ルブラー CWS である乳化製剤の上記 1 から 3 に記載記載の分析方法。

(5) 細菌の菌体成分を有効成分とする製剤において、菌体成分が油状物質に充分被覆された製剤の下記の工程を含むことを特徴とする分析方法：

(a) 細菌の菌体成分を含む製剤にレクチン溶液を添加し

(b) レクチンとの凝集反応が無いことを指標として細菌の菌体成分が充分被覆されていることを分析する。。

(6) 細菌の菌体成分を有効成分とする製剤が水中油型エマルジョン製剤である上記 5 記載の分析方法。

(7) レクチンがコンカナバリン A である上記 5 および 6 記載の分析方法。

(8) 細菌の菌体主成分が BCG-CWS あるいはノカルジア・ルブラー CWS である乳化製剤の上記 5 から 8 に記載記載の分析方法。

(9) 上記 1 あるいは 5 記載の分析方法によって選別され得られた、菌体成分が充分油状物質で被覆された生物活性製剤。

(10) 水中油型エマルジョン製剤を使用して得られる上記 9 記載の生物活性製剤。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の第 1 の態様は、細菌の菌体成分を有効成分とする製剤品とレクチンとを反応させ凝集反応の有無を指標として判定することにより、免疫賦活作用が維持された生物活性製剤を評価選別できる方法に関するものである。すなわち、本

発明の分析方法で陰性となった製剤品は、菌体成分が油状物質で充分被覆されている製剤品と考えられ、細菌の菌体成分の有する免疫賦活作用が維持されていることが明らかとなった。それ故、細菌の菌体成分を有効成分とする製剤品の中で生物活性のある製剤を選別する簡便な方法として本発明の分析方法を用いることが出来ることが示された。

本発明の生物活性製剤とは、細菌の菌体成分が有する免疫賦活作用を保持する製剤であり、その生物活性は、例えば、癌転移抑制試験によりその有無を評価検定することが出来る。癌転移抑制試験の結果は、未処置の群を抑制率0%として、製剤品を投与した群との抑制率とを比較し評価することが出来る。

【0009】

本発明で使用可能な免疫賦活作用を有する菌体成分としては、微生物死菌や微生物由来のCWS、ムラミルヂペプチド(MDP)、リポ多糖(LPS)、マンナン、グルカンおよびこれらの誘導体等が挙げられる。微生物死菌の例としては、ヒト型結核菌の死菌などが挙げられる。CWSの由来微生物としては、マイコバクテリア属、ノカルディア属、コリネバクテリア属、プロピオニバクテリウム属などが挙げられる。中でも好ましい例として、マイコバクテリア属ウシ型結核菌であるBCGおよびノカルディア・ルプラを挙げることができる。これらのCWSは、物理的に細菌を粉碎した後、除核酸、除タンパク、脱脂などの精製工程を経て得られる不溶性残渣として得られ、その製法自体は公知である。

【0010】

本発明で使用可能な油状物質としては、Immunology第27巻、第311~329項(1974年)に記載されているような鉱物油、動植物油が挙げられる。鉱物油としては、流動パラフィン、バイオール(Bayol F)、ドラケオール(Drakeol)-6VRなどが挙げられる。植物油としては、落花生油、ゴマ油、AD-65(落花生油とアラセルとアルミニウムモノステアレートの混合物)等が挙げられる。動物油としては、スクワラン、スクワランのようなテルペノイド誘導体が挙げられる。好ましい例としては、ドラケオール6VR、スクワランを挙げることができる。

【0011】

本発明で使用可能なレクチンは、菌体成分の糖類(アラビノガラクトサン)と相

相互作用するレクチンで有れば特に限定するものではないが、多糖類中の α -D-マンノース残基、 α -D-グルコース残基にを認識するレクチンで有れば好ましく、例えば、コンカナバリンA、レンチル・レクチン、ピー・レクチン等のレクチン類が挙げられる。好ましいレクチンとしてはコンカナバリンAが挙げられる。

【0012】

本発明で分析の指標となる凝集反応とは、蛍光顕微鏡、または位相差顕微鏡により目視的に菌体成分の凝集が確認できるものである。例えばBCG-CWS乳化製剤品で凝集反応を示すものは、レクチンを加えると図2に示されるようにエマルションの凝集が目視的に確認できるようになる。従って、凝集反応が陽性である場合は、このような凝集塊が生じることを言う。逆に陰性である場合は、このような凝集塊が生じず、油状物質で被覆された菌体成分がほぼ平均して分散していることを言う。

凝集反応の確認方法としては、例えばBCG-CWS乳化製剤品とレクチン（コンカナバリンA）溶液をピペティングで混合し、25℃で30分以上放置し、位相差顕微鏡などを用いて凝集反応の有無を確認することが挙げられる。その結果は例えば、図1、2に示されるように油状物質を含まない、菌体成分のみの製剤品（オイル・フリー：参考例3）や、公知調製法の改良法（参考例2）の場合には、凝集反応が生じる。一方、菌体成分が油状物質で充分被覆されている製剤品の場合には、図3から5に示されるように凝集反応が生じない（参考例1、4、5）。このようにして、凝集反応の有無を見ることで、油状物質での被覆の是非を見分けることができる。

【0013】

本発明の第2の態様は、細菌の菌体成分を有効成分とする製剤品とレクチンとを反応させ、凝集反応の有無を指標として判定することにより、その製剤品中の菌体成分が油状物質によって充分被覆されているか否かを評価選別できる方法に関するものである。

本発明で使用可能な細菌の菌体成分を有効成分とする製剤品とは、水中油型のエマルション等の乳化製剤、あるいはその製造中間に存在する菌体成分などが挙

げられる。

【0014】

本発明の第3の態様は、本発明の上記分析方法で判定され選別されて得られる細菌の菌体成分を有効成分とする生物活性製剤に関するものである。

本発明の生物活性製剤品として好適なものは、菌体成分（例えばBCG-CWS）を油状物質（例えばスクワラン）で充分被覆するため分散補助溶媒（例えばトルエン）を使用した水中油型のエマルション等の乳化製剤などが挙げられる。

【0015】

本発明に係る水中油型エマルション製剤は、注射など非経口で投与できる。投与形態は、治療目的などにより異なり、特に制限されるものではない。非経口的に投与する場合、通常用いられる投与形態として例えば、注射剤として皮膚より投与すること等ができる。

投与量、投与回数は対象とする疾患、患者の症状、年齢、体重、性別等によって異なるが、非経口投与する場合、特に注射剤として使用する場合には、通常は成人に対して週1回若しくは4週1回の投与で1回当たり10～250 μ gの範囲、好ましくは25～200 μ gの範囲を投与することができる。

【0016】

【実施例】

以下、実施例、試験例をあげて本発明を更に詳しく説明するが、本発明がこれらによってなんら限定されるものではない

【0017】

実施例1 評価検定試験

参考例1から5で得られた製剤品（BCG-CWS濃度として、1mg/ml）200 μ lを使用し、コンカナバリンA溶液（コンカナバリンAの濃度として、1mg/ml 0.2mM）50 μ lを加えて、25℃で30分以上保持した。反応液を位相差顕微鏡で観察し、凝集反応の有無を確認した。その結果を図1から5に示した。

【0018】

参考例1（公知調製法）

菌体成分としてBCG-CWS 4 mgとスクワラン20 μ l (0.5%w/w)をPotter-Elvehjem型ホモジナイザーに加えて分散し、その後0.2%w/wポリソルベート80/5%マンニトール水溶液4 mlを添加し、同ホモジナイザーで乳化した後60℃30分間加温し水中油形エマルションを得た。

【0019】

参考例2 (公知調製法の改良法)

菌体成分としてBCG-CWS 4 mgと蒸留水2 mlをPotter-Elvehjem型ホモジナイザーに加えて分散し原体分散液を調製した。この原体分散10%マンニトール水溶液2 mlを加えて混合し、スクワラン20 μ l (0.5%w/w)を加えて同ホモジナイザーで分散したさらに、10%w/wポリソルベート80水溶液80 μ lを添加し、同ホモジナイザーで乳化した後60℃30分間加温、滅菌して、水中油形エマルションを得た。

【0020】

参考例3 (オイルフリー公知調製法)

菌体成分としてBCG-CWS 4 mgと0.2%w/wポリソルベート80/5%マンニトール水溶液4 mlをPotter-Elvehjem型ホモジナイザーに加えて分散、乳化した後60℃30分間加温し水中油形エマルションを得た。

【0021】

参考例4 (分散補助溶媒：エタノール)

菌体成分としてBCG-CWS 4 mgを用いてスクワラン20 μ l (0.5%w/w)と分散補助溶媒として用いるエタノール4 mlの混合液に加え震とうあるいは超音波により室温で分散した。その後窒素気流下60℃に加温しエタノールを留去した。つぎに0.2%w/wポリソルベート80/5%マンニトール水溶液4 mlを添加し、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーを用い1000rpm/5分間ので乳化を行った後、60℃30分間加温殺菌し水中油形エマルションを得た。

【0022】

参考例5 (分散補助溶媒：トルエン)

実施例1で分散補助溶媒として用いられたエタノールの代わりにトルエンを使用する以外は参考例4と同様に調製し、所望の水中油型エマルションを得た。

【0023】

試験例 1 生物活性試験

実施例および参考例に記載の製剤を水により再溶解した水中油型エマルションについて、マウス腫瘍転移モデル系により生物活性を比較し、製剤調製法の違いによる生物活性の変化を確認した。

8週齢のBALB/Cマウス5匹を一群として使用した。マウス尾静脈より 2.5×10^4 個/匹のColon26-M3.1腫瘍細胞を移植し、実施例および参照例の製剤品を同様に一日当りBCG-CWSとして $100 \mu\text{g} / 200 \mu\text{l}$ /マウスを投与した。2週間後開胸し、胚摘出を行い肺に転移した腫瘍巣数を計数し、コントロールの未処置マウスとの比較を行った。結果を表1に示した。

【0024】

【表1】

| 製剤品 | レクチンとの凝集反応 | マウス肺癌転移抑制効果 (%) |
|------|------------|-----------------|
| 未処置 | | 0 |
| 参考例1 | — | 52 |
| 参考例2 | + | 0 |
| 参考例3 | + | 6 |
| 参考例4 | — | 56 |
| 参考例5 | — | 37 |

図3、4、5および表1に示すとおり、凝集反応が陰性を示す公知調製法で得られた製剤品と参考例4、5で得られた製剤品は、同等の生物活性を有するものであることが明らかとなった。なお、「—」は陰性を表し、「+」は陽性を表す。

【0025】

【発明の効果】

本発明の製剤分析方法は製剤中に含有される菌体成分が有効な免疫賦活作用を維持していることを簡便に評価検定できる方法であり、かつ生体反応的に油状物質で菌体成分が充分被覆されていることを簡単に選別できる方法である。この分析方法によって、初めて生物活性が安定に維持された製剤品の提供が可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 参考例 3 に記載の油状物質を含まない製剤品のレクチン凝集反応試験の結果を示す。

【図 2】 参考例 2 に記載の公知調製法の改良法製剤品のレクチン凝集反応試験の結果を示す。

【図 3】 参考例 1 に記載の公知調製法製剤品のレクチン凝集反応試験の結果を示す。

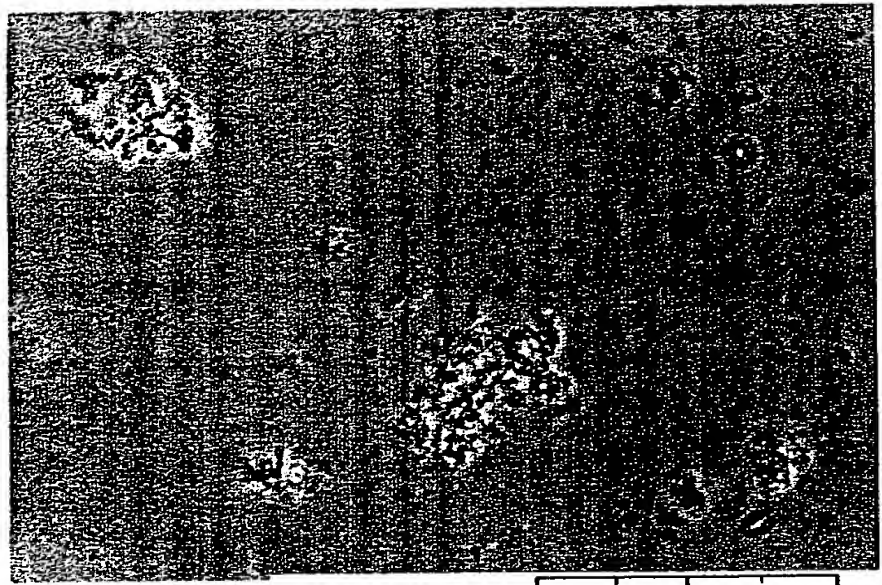
【図 4】 参考例 4 に記載のエタノール溶媒分散改良法製剤品のレクチン凝集反応試験の結果を示す。

【図 5】 参考例 5 に記載のトルエン溶媒分散改良法製剤品のレクチン凝集反応試験の結果を示す。

【書類名】

図面

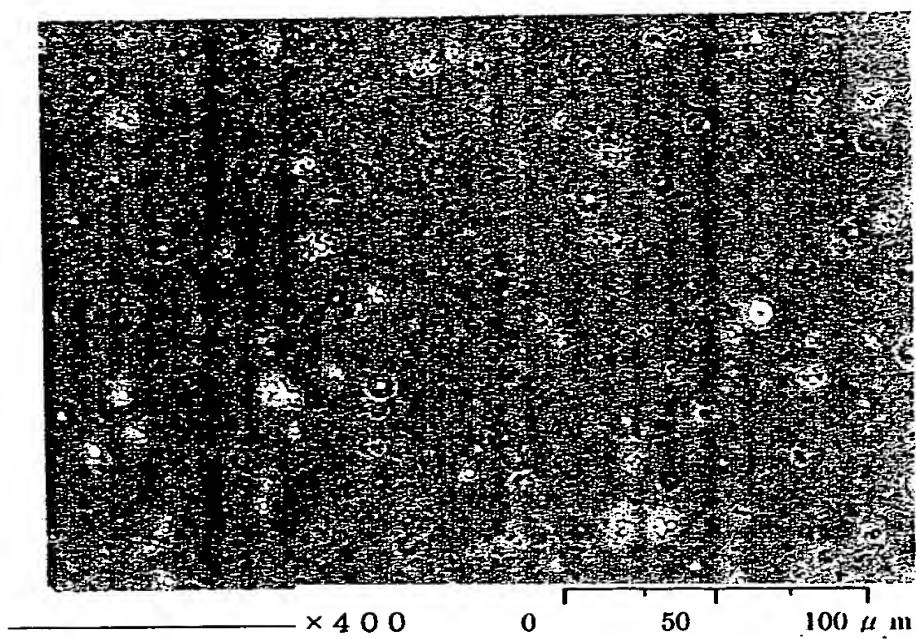
【図 1】



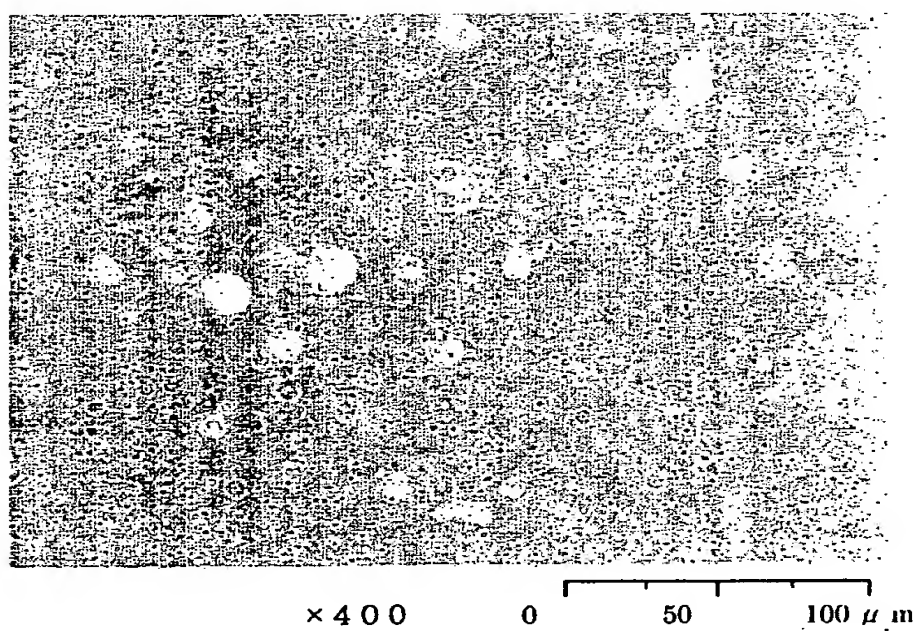
【図 2】



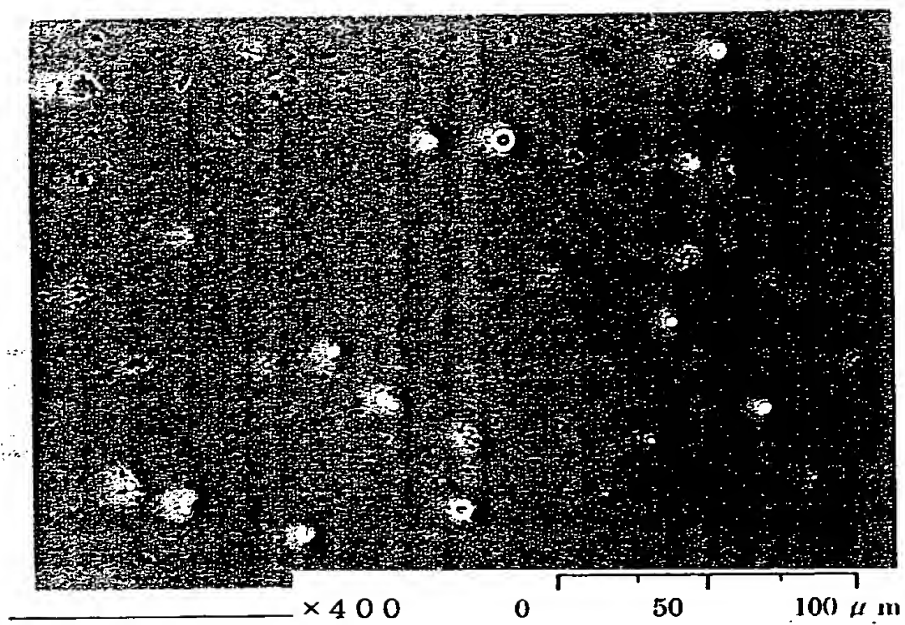
【図 3】



【図 4】



【図5】



【書類名】

要約書

【要約】

【課題】免疫賦活作用を維持していることを簡便に評価検定でき、かつ油状物質で菌体成分が充分被覆されていることを簡単に選別できる分析方法。

【解決手段】レクチンとの凝集反応がないことを指標として細菌の菌体成分が充分被覆されている製剤を選別し、かつ充分被覆されていることを分析する。さらには、この分析方法によって生物活性が安定に維持された製剤品の提供が可能となった。

【選択図】 なし。

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成10年 8月21日

【特許出願人】

【識別番号】 592028019

【住所又は居所】 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号

【氏名又は名称】 東 市郎

【特許出願人】

【識別番号】 597032387

【住所又は居所】 大阪府吹田市津雲台3丁目9番5号

【氏名又は名称】 林 昭

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100107629

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住
友製薬株式会社 法務部内

【氏名又は名称】 中村 敏夫

特平 10-236148

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [592028019]

| | |
|----------|----------------------|
| 1. 変更年月日 | 1991年12月27日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号 |
| 氏 名 | 東 市郎 |

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597032387]

| | |
|----------|------------------|
| 1. 変更年月日 | 1997年 3月 7日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 大阪府吹田市津雲台3丁目9番5号 |
| 氏 名 | 林 昭 |

特平10-236148

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000183370]

1. 変更年月日

1990年 8月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名

住友製薬株式会社